双启动子促进亮氨酸脱氢酶在 *Bacillus subtilis* 中表达及发酵研究*

张玲 王男 金吕华 林荣 杨海麟**

（江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：为了促进亮氨酸脱氢酶在 *Bacillus subtilis* 中高效表达，采取在质粒 pMA5 自带的启动子 P_{HpaII} 之后分别添加诱导型和组成型启动子，考察双启动子对酶表达的影响。选取 2 种诱导型启动子（P_{grac}、$P_{gl\text{-}M1}$）和 4 种组成型启动子（P_{43}、P_{laps}、P_{HpaII}、P_{amyQ}）进行构建表达，其中组成型启动子 P_{amyQ} 与 P_{HpaII} 构成的双启动子效果最好，有效地将胞外活性提高到 31.24 U·mL^{-1}，是单启动子 P_{HpaII} 的 3.4 倍。在以上最优双启动子的基础上分别融合 *Sec* 途径和 *Tat* 途径的 4 种信号肽，但信号肽与双启动子共同作用并没有获得更高的酶活性。选用酶活最高的双启动子突变菌株 *Bacillus subtilis* 168/pW6（P_{HpaII}-P_{amyQ}）进行 7.5 L 发酵罐补料发酵产酶研究，LeuDH 酶活达到 217.96 U·mL^{-1}，是摇瓶水平的 6.97 倍，对工业上产亮氨酸脱氢酶有一定参考价值。

关键词 亮氨酸脱氢酶 枯草芽孢杆菌 启动子 信号肽 发酵产酶

亮氨酸脱氢酶（EC 1.4.1.9，LeuDH）是一类氧化还原酶，该酶在催化生成医药中间体手性氨基酸[1]及临床生化诊断（新生儿枫糖尿病的筛查[2,3]、支链脂肪酸及其酮酸类似物的测定[4]等）有重要作用。枯草芽孢杆菌具有易于培养、不产内毒素、不易形成包涵体、可将表达产物直接分泌到胞外，对后期的分离纯化提供便利等优点，被广泛应用于外源蛋白的表达，对同属来源的异源蛋白在表达上具有理论优势。

实现异源蛋白在枯草芽孢杆菌中的高效分泌表达，使用强启动子以及选择合适的信号肽是较为有效的手段。启动子可准确起始转录以及控制外源基因表达的程度，运用最多的启动子类型为组成型和诱导型两种。组成型启动子具有强启动、不需添加诱导剂、可直接产生目的蛋白以及成本低等优势，常见的如 P_{43}[5,6]、P_{HpaII}[7]、P_{laps}[8]及 P_{amyQ}[9]；诱导型启动子可在特定的时期调控异源蛋白的表达量，具有可控、快速、大量等特点，如 P_{grac}[10]、P_{spac}[11]、P_{xyl}[12]等。目前，已经有大量研究表明添加启动子后可有效促进外源蛋白的表达，Guan C 等[13]筛选的双启动子 P_{HpaII}-P_{gsiB} 表达的氨肽酶（AP）活性分别为单启动子 P_{HpaII} 和 P_{gsiB} 的 2.3 和 2.2 倍；周勇[14]通过杂合串联启动子 P_{43}-P_{grac} 对脂肪酶进行诱导表达，总酶活提高至 60.97 U·L^{-1}，比优化前增加了 53.77%。启动子后融合合适的信号肽，能够实现目的蛋白高效分泌表达，夏雨[15]等筛选到 Bpr 信号肽对脂肪酶 A 有较高

* 江苏省产学研 BY2016022-40；国家轻工技术与工程一流学科自主课题资助（2018-23）

** 通讯作者, 电子信箱: yanghailin@jiangnan.edu.cn

的分泌效率，胞外活性占该菌株脂肪酶 A 总表达量的 86%。

本研究团队前期已通过信号肽筛选策略提高了 *Bacillus cereus* ATCC14579 来源的 LeuDH 基因在枯草芽孢杆菌中的表达活性[16]。本实验在质粒 pMA5 自身启动子 P_{HpaII} 基础上添加诱导型启动子 P_{grac}、$P_{glv\text{-}M1}$ 和组成型启动子 P_{43}、P_{laps}、P_{HpaII}、P_{amyQ} 研究双启动子对亮氨酸脱氢酶在枯草芽孢杆菌中表达的影响。之后，在最佳双启动子 P_{HpaII}-P_{amyQ} 后融合前期研究中对 LeuDH 分泌效果较好的 4 种信号肽（AmyQ、SacB、PhoD 和 YwbN），筛选适合亮氨酸脱氢酶分泌表达的启动子和信号肽组合。对表达 LeuDH 效果最好的重组菌进行 7.5 L 发酵罐放大实验，探究发酵产酶水平，为工业上实现亮氨酸脱氢酶的高效表达提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材　料

1.1.1　菌株和质粒　克隆宿主 *E. coli* JM109、表达宿主 *B. subtilis* 168、质粒 pMA5、pMA5-*leudh*、pHT43 均由本实验室保存，质粒 pW1（P_{HpaII}-P_{grac}）、pW2（P_{HpaII}- $P_{glv\text{-}M1}$）、pW3（P_{HpaII}-P_{43}）、pW4（P_{HpaII}-P_{laps}）、pW5（P_{HpaII}-P_{HpaII}）、pW6（P_{HpaII}-P_{amyQ}）、pW6I（P_{HpaII}-P_{amyQ}，SP）、pW6II（P_{HpaII}-P_{amyQ}）、pW6III（P_{HpaII}-P_{amyQ}）、pW6IV（P_{HpaII}-P_{amyQ}）为本研究构建。

1.1.2　主要试剂　限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、rTaq DNA 聚合酶、蛋白质 Low Marker、DNA Marker 均购自大连宝生物有限公司；DNA 凝胶回收试剂盒：Axygen；革兰氏阳性细菌 DNA 抽提试剂盒，蛋白胨、酵母膏：上海生工股份有限公司；其他所用试剂均购于国药集团药业股份有限公司。

1.1.3　培养基　LB 培养基（g/L）：蛋白胨 1，酵母粉 5，NaCl 10；TB 培养基（g/L）：蛋白胨 12，酵母粉 24，甘油 5，$K_2HPO_4.3H_2O$ 16.43，KH_2PO_4 2.30；发酵培养基（g/L）：蛋白胨 12，酵母粉 24，葡萄糖 10，酵母浸膏 10，$K_2HPO_4\cdot 3H_2O$ 16.43，KH_2PO_4 2.30，1 mmol·L^{-1} $MgSO_4\cdot 7H_2O$、1 mmol·L^{-1} $ZnSO_4$，卡那霉素 100 μg/mL；SPI 培养基：SP 盐溶液加入 1 %体积浓度为 50%葡萄糖溶液，1 %体积 100×CAYE 溶液；SPII 培养基：SPI 培养基加入 1 %体积 50 mmol/L $CaCl_2$ 溶液，1 %体积 250 mmol/L $MgCl_2$ 溶液；SP 盐：0.2%(NH_4)$_2SO_4$，1.4% K_2HPO_4，0.6% KH_2PO_4，0.02% $MgSO_4\cdot 7H_2O$，0.1% 柠檬酸钠；CAYE (100×)：2 % Casamino acid，10%酵母膏；EGTA(100×): 10mmol/L EGTA 溶液（溶解时加入 NaOH 调 pH 至 8.0）。

1.2 方　法

1.2.1　重组质粒 pW1 (P_{HpaII}-P_{grac})的构建　以质粒 pHT43 为模板，设计引物 P_{grac}-F/R，对

P_{grac} 启动子 PCR 扩增，对扩增的目的基因和质粒 pMA5-*leudh* 分别使用 *Nde* I、*Bam*H I 双酶切，跑胶回收片段用 T4 DNA 连接酶 4°C 连接过夜，将连接液转化 *E. coli* JM109，对克隆菌株 *E. coli* JM109/pW1 提质粒酶切验证并由苏州泓讯生物有限公司进行测序，条带大小符合以及序列正确的质粒即为 pW1。重组质粒 pW3 (P_{HpaII}-P_{43})、pW5 (P_{HpaII}-P_{HpaII})、pW6 (P_{HpaII}-P_{amyQ})的构建同上。主要区别在于 pW3 和 pW6 以 *B. sutilis* 168 基因组 DNA 为模板，P_{43}-F/R、P_{amyQ}-F/R 为引物进行扩增；pW5 以质粒 pMA5 为模板，P_{HpaII}-F/R 为引物进行扩增。

启动子 P_{glv-M1}、P_{laps} 序列由苏州鸿讯生物有限公司合成并连接到质粒 pMA5-*leudh*，得到重组质粒 pW2 和 pW4。

1.2.2 重组质粒 pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ)、pW6II (P_{HpaII}-P_{amyQ}, SacB)、pW6III (P_{HpaII}-P_{amyQ}, PhoD)和 pW6IV (P_{HpaII}-P_{amyQ}, YwbN)的构建　在重组质粒 pW6 (P_{HpaII}-P_{amyQ})的基础上，通过重叠 PCR 引入 *Sal* I 位点构建分泌表达质粒 pW6I。构建过程如下：分别以 *B. sutilis* 168 基因组 DNA 以及全基因合成的 *leudh* 为模板，使用引物对 SamyQ-F1/R1 和 SamyQ-F2/R2 克隆 AmyQ 信号肽和 *leudh* 基因，两片段回收纯化后，将其等比例混合并作为模板，通过引物 SamyQ-F1/R2，扩增融合片段。之后将该片段通过酶切位点 *Bam*H I 和 *Mlu* I 连接在质粒 pW6 上，构建分泌表达质粒 pW6I。

重组质粒 pW6I 引入的酶切位点 *Sal* I 为其他信号肽的加入提供了方便。通过 PCR 分别将 SacB、PhoD 以及 YwbN 两端引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Sal* I，之后将质粒 pW6I 以及扩增得到的信号肽片段同时双酶切，经胶回收纯化及 T4 DNA 连接酶连接后，构建得到相应的分泌表达质粒 pW6II、pW6III 和 pW6IV。

1.2.3 枯草芽孢杆菌感受态和转化　从 37℃培养过夜的种子液中取 100μL 接种至 5 ml SPI 培养基中，37℃摇床培养，当培养物 OD600 生长到对数末期时（约 3 h），快速取 200μL 接种到 2ml SPII 培养基中，于 37℃100 rpm 摇床培养 1.5h。加 20 μL 100×EGTA 溶液，于 37℃100 rpm 摇床培养 10 min，用 1.5ml 离心管分装成 500μL 每管。向管中加入适量的质粒，轻轻混匀于 37℃ 100 rpm 摇床培养 30 min。将离心管转移到 250 rpm 摇床，37℃培养 1.5h。以 4000 rpm 离心收集菌体，弃部分上清液，留 100μL 重悬菌体，涂相应的选择性平板，37℃过夜培养。 具体方法参考江南大学夏雨博士论文[17]

1.2.4 重组菌培养条件　挑单菌落于 LB 培养基（50 ug/mL Kan^r）中培养过夜，次日按 4%接种量转接至 50 mL TB 培养基（50 ug/mL Kan^r）中培养。含诱导型启动子重组菌培养到 OD600=0.6-0.8 时，加入终浓度为 0.8mmol 的 IPTG 进行诱导表达；含组成型启动子重组菌继续进行培养，定时取样。

表 1 引物序列表

Table1 List of primers

引物	序列
P_{grac}-F	GGGAATTCCATATGAGCTATTGTAACATAATCGG

P_{grac}-R	CGCGGATCCTGATCCTTCCTCCTTTAATT
P_{43}-F	GGGAATTCCATATGTGATAGGTGGTATGTTTTCGC
P_{43}-R	CGCGGATCCGTGTACATTCCTCTCTTACCT
P_{HpaII}-F	GGGAATTCCATATGGGTGGAGATTTTTTGAGTGAT
P_{HpaII}-R	CGCGGATCCTAAATCGCTCCTTTTTAGGTG
P_{amyQ}-F	GGGAATTCCATATGGGCGGCGTTCTGTTTCTG
P_{amyQ}-R	CGCGGATCCATAAGGCAGTAAAGAGGTTTTG
SamyQ-F1	CGCGGATCCATGATTCAAAAACGAAAGCGG
SamyQ-R1	ATTCGAAGATCTCCAGGGTCATGTCGACTACGGCTGATGTTTTTGTAATCGGC
SamyQ-F2	GCCGATTACAAAAACATCAGCCGTAGTCGACATGACCCTGGAGATCTCCGAAT
SamyQ-R2	CGACGCGTTTAACGACGGCTAATGATATCGTGACCG
SsacB-F1	CGCGGATCCATGAACATCAAAAGTTTGC
SsacB-R1	ACGCGTCGACCGCAAACGCTTGAGTTGCGCCT
SphoD-F1	CGCGGATCCATGGCATACGACAGTCGTTTTG
SphoD-R1	ACGCGTCGACGGCCCCAACCGACTGGGCAATC
SywbN-F1	CGCGGATCCATGAGCGATGAACAAAAAAAGCC
SywbN-R1	ACGCGTCGACCGCAACGGCTGCCCCCGCCAT

Annotation：underline represent restriction endonucleases cleavage sites

1.2.5 重组酶活力测定方法 反应体系 3 mL，在含 20 mM 亮氨酸的 0.2 M 甘氨酸-KCl-KOH（pH 10.5）缓冲液中加入 12.5 mM NAD^+溶液，37℃平衡 5 min 后加入酶液摇匀，不加酶液为对照，340 nm 波长测定 3 min 内吸光值变化。酶活定义为上述条件下，每分钟生成 1umol NADH 所需的酶量为一个酶活单位。重组酶用 SDS-PAGE 进行表观分子量估算。

1.2.6 SDS-PAGE 凝胶电泳分析 将培养 48h 发酵液，4℃ 8000rpm 离心 15min，取发酵上清液 30 uL，加入 10 uL 的 4×SDS 上样电泳缓冲液？，沸水中煮沸 10 分钟，冷却离心取上清液作为电泳上样样品。SDS-PAGE 凝胶电泳采用 5%的浓缩胶与 12%的分离胶，电泳缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-Gly 缓冲液，电泳后用考马斯亮蓝染色。

1.2.7 菌体生物量的测定 取不同培养时间的菌悬液，稀释至适当倍数，通过分光光度计测定 OD_{600} 下吸光值。每间隔一段时间取培养菌液 15 mL，于 4°C，8000 $r{\cdot}min^{-1}$ 离心 10 min，弃上清，菌体用 PB 缓冲液洗涤两次，置于 105°C 干燥箱中，烘干至恒重。称量菌体重量，计算出 OD_{600} 和菌体干重之间的线性方程，一个单位的 OD_{600} 约为干菌 0.41 $g{\cdot}L^{-1}$。

1.2.8 葡萄糖含量的测定 取 1 mL 发酵液离心，对离心后的发酵液稀释，使葡萄糖浓度在 0-100 $mg{\cdot}100mL^{-1}$ 之间，使用仪器生物传感分析仪 SBA-40C 测定其含量。仪器打开后自动清洗一次，进样灯亮并闪烁，且屏幕处于零状态时，将润洗好的 50 μL 微量注射器吸取 25 μL 葡萄糖标准溶液注入进样口，进行校定。当进样灯处于亮但不闪动状态时，吸取 25 μL 待测发酵液注入进样口，屏幕显示数值即为测定结果。

2 结果与讨论

2.1 添加诱导型启动子重组质粒 pW1 (PHpaII-Pgrac)的构建及表达

2.1.1 含诱导型启动子重组菌的构建

选择诱导型启动子 P_{grac} 和 $P_{glv\text{-}M1}$ 添加到质粒 pMA5 自身启动子 P_{HpaII} 后，构建含双启动子 P_{HpaII}-P_{grac} 和 P_{HpaII}-$P_{glv\text{-}M1}$ 的重组质粒 pW1 和 pW2，探究诱导型启动子的添加对 LeuDH 表达的影响。诱导型启动子构建示意图如图 1 所示。

通过 PCR 方法，以质粒 pHT43 为模板扩增启动子 P_{grac} 片段，如图 2(a)所示，扩增的启动子片段与质粒 pMA5 通过 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点连接，对重组质粒进行双酶切以及测序验证，得到大小约为 180 bp 和 8.6 Kb 的 P_{grac} 和质粒片段(含目的基因 *leudh*)，结果如图 2 (b)。

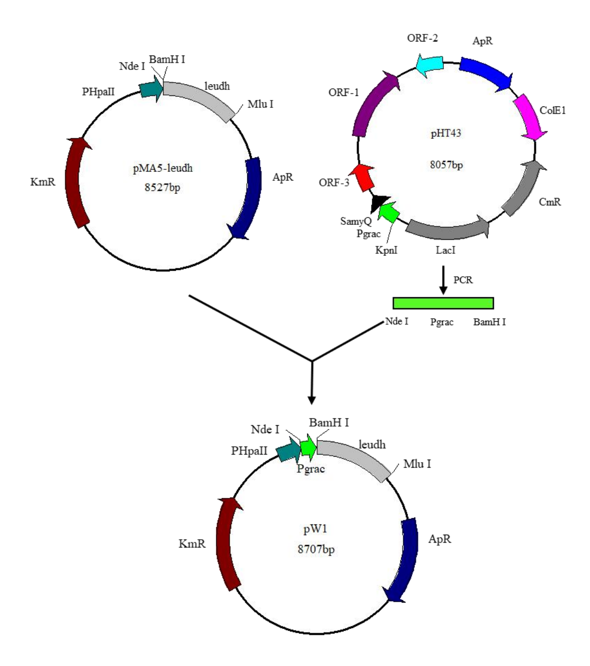


图 1 诱导型启动子重组质粒构建示意图

Fig. 1 Construction procedure of recombinant plasmid with inducible promoters

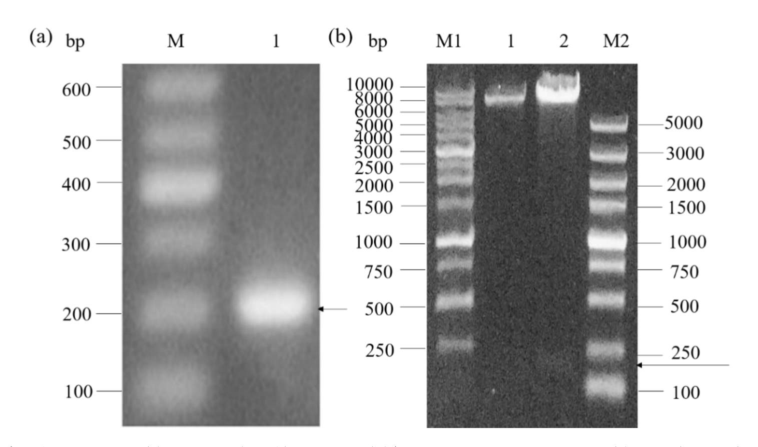


图 2 启动子 P_{grac} 的 PCR 扩增(a)及质粒 pW1 (P_{HpaII}-P_{grac})的双酶切验证(b)

Fig. 2 PCR of promoter P_{grac} (a) and restriction digestion (b)

(a) M: DNA marker; 1: PCR verification of P_{grac}; (b) M1、M2: DNA marker; 1: pMA5-*leudh* digested with *Bam*H I ; 2: pW1 (P_{HpaII}-P_{grac}) double digested with *Bam*H I and *Nde* I

启动子 P_{glv-M1} 序列由苏州泓讯生物技术有限公司合成，连接到质粒 pMA5-*leudh* 上。对验证正确的质粒转化 *B. subtilis* 168，构建菌株 *B. subtilis* 168/pW1 (P_{HpaII}-P_{grac})和 *B. subtilis* 168/pW2 (P_{HpaII}-P_{glv-M1})。

2.1.2 含诱导型启动子重组菌的表达

对加入诱导型启动子的菌株 *B. subtilis* 168/pW1 (P_{HpaII}-P_{grac})和 *B. subtilis* 168/pW2 (P_{HpaII}-P_{glv-M1})进行生长曲线和酶活曲线测定，了解诱导型启动子对 LeuDH 表达的影响。两株菌生长曲线的测定以生长至对数生长期加入诱导剂时开始记起，*B. subtilis* 168/pW1 (P_{HpaII}-P_{grac})培养到 24 h 时 OD_{600} 达到最大值，为 8.06；*B. subtilis* 168/pW2 (P_{HpaII}-P_{glv-M1}) 培养到 12 h 时 OD_{600} 达到最大，为 9.12，菌体生长至对数期时间明显缩短，可能是加入诱导剂麦芽糖后，其作为碳源加快了菌体生长，结果如图 3 (a) 所示。

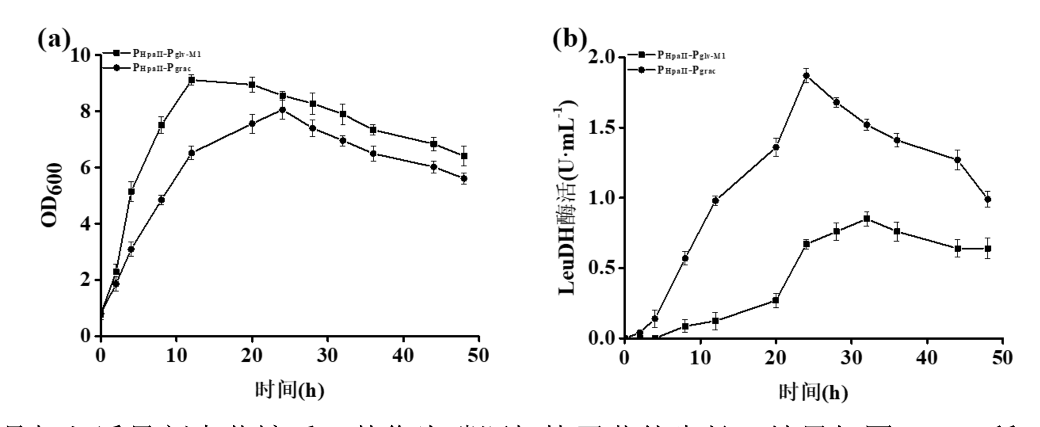


图 3 含诱导型启动子重组菌生长曲线(a)及酶活曲线(b)

Fig.3 Cell growth curves (a) and extracellular enzyme activity curves of different recombinants with inducible promoters (b)

表 2 含诱导型启动子 P_{grac} 和 P_{glv-M1} 重组菌产酶比较

Table 2 Comparison of LeuDH activity by recombinants contained inducible promoter P_{grac} and P_{glv-M1}

重组菌	培养时间 (h)	胞外活性 ($U·mL^{-1}$)	胞内活性 ($U·mL^{-1}$)	总酶活 ($U·mL^{-1}$)
B. subtilis 168/pW1 (P_{HpaII}-P_{grac})	24	1.87	18.61	20.58
B. subtilis 168/pW2 (P_{HpaII}-P_{glv-M1})	32	0.82	0.54	1.36

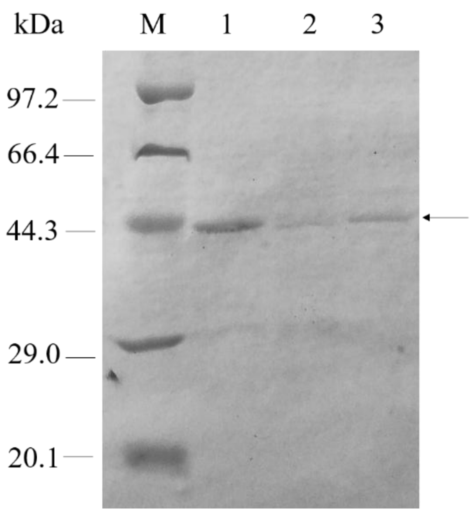


图 4 含诱导型启动子重组菌产 LeuDH 发酵上清的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of LeuDH extracellular activity contained inducible promoters

M: Protein marker (Low); 1: *B. subtilis* 168/pMA5-*leudh* (P_{HpaII}) (control); 2: Culture supernatants of *B. subtilis* 168/pW2 (P_{HpaII}-P_{glv-M1}); 3: *B.* Culture supernatants of *subtilis* 168/pW1 (P_{HpaII}-P_{grac})

含诱导型启动子 P_{grac} 和 P_{glv-M1} 重组菌的酶活曲线如图 3 (b)所示，启动子 P_{grac} 对 LeuDH 的表达效果优于启动子 P_{glv-M1}，但两种启动子对 LeuDH 的调控作用均未实现预期效果。加入 0.8 mmol·L^{-1} IPTG 对重组菌 *B. subtilis* 168/pW1 (P_{HpaII}-P_{grac})进行诱导表达，24 h 时总酶活为 20.58 U·mL^{-1}，对 LeuDH 的表达有一定作用，但胞外活性不高，仅为 1.87 U·mL^{-1}；加入 2%的麦芽糖对重组菌 *B. subtilis* 168/pW2 (P_{HpaII}-P_{glv-M1})进行诱导表达，32 h 时测得活性最大值，但总酶活仅有 1.36 U·mL^{-1}，产酶水平低，具体产酶情况及 SDS-PAGE 分析见表 2 和图 4。

2. 2 添加组成型启动子重组质粒的构建及表达

2.2.1 添加组成型启动子重组质粒的构建

以 *B. subtilis* 168 的 DNA 为模板，PCR 扩增 P_{HpaII}、P_{43} 和 P_{amyQ} 启动子片段，电泳鉴定 PCR 扩增产物，如图 5 (a)所示，PCR 扩增片段大小分别约为 302 bp、312 bp 和 367 bp，和理论大小相同。扩增的启动子片段和质粒 pMA5-*leudh* 分别通过 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切后连接，获得含双启动子的重组质粒。对构建的质粒进行双酶切验证，条带大小与启动子片段大小一致，结果如图 5(b)，随后进行测序验证，基因序列正确。

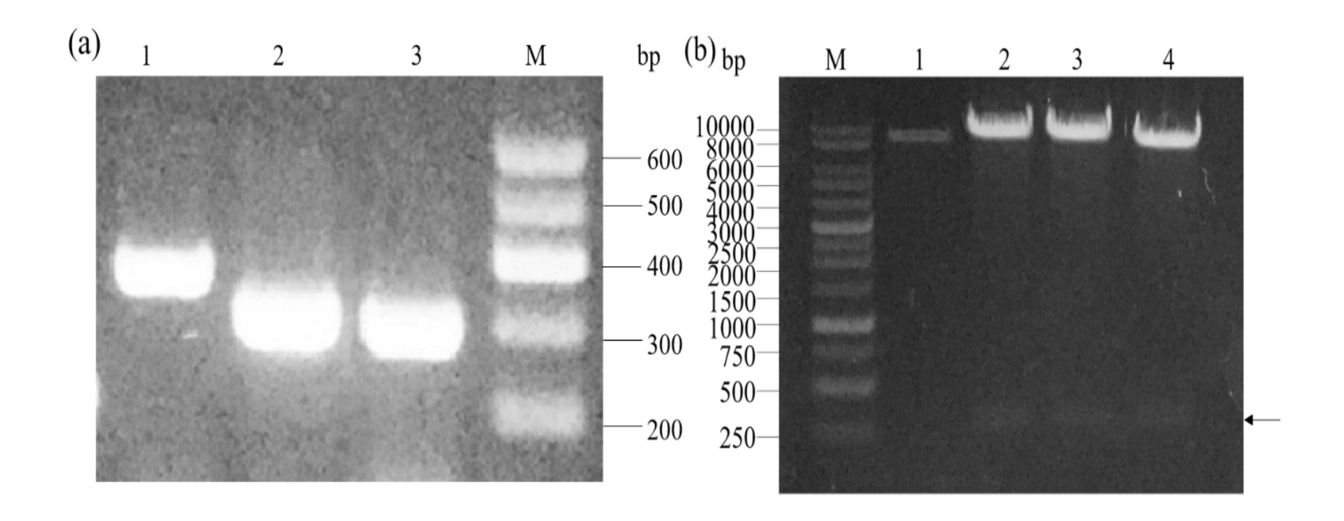


图 5 组成型启动子 PCR(a)及酶切验证(b)

Fig. 5 PCR of consistant promoters (a) and restriction digestion (b)

(a) M: marker; 1: PCR verification of P_{amyQ}; 2: PCR verification of P_{43}; 3: PCR verification of P_{HPaII}; (b) M: marker; 1: pMA5-*leudh* digested with *Bam*H I (control); 2: pW3 (P_{HpaII}-P_{43}) double digested with *Bam*H I and *Nde* I; 3: pW5 (P_{HpaII}-P_{HpaII}) double digested with *Bam*H I and *Nde* I; 4: pW6 (P_{HpaII}-P_{amyQ}) double digested with *Bam*H I and *Nde* I

2.2.2 含组成型启动子重组菌的表达

添加不同的启动子元件，对菌株生长及产酶特性都会产生影响。在添加组成型启动子后，对重组菌进行发酵曲线测定，了解其生长规律，结果如图 6 所示。

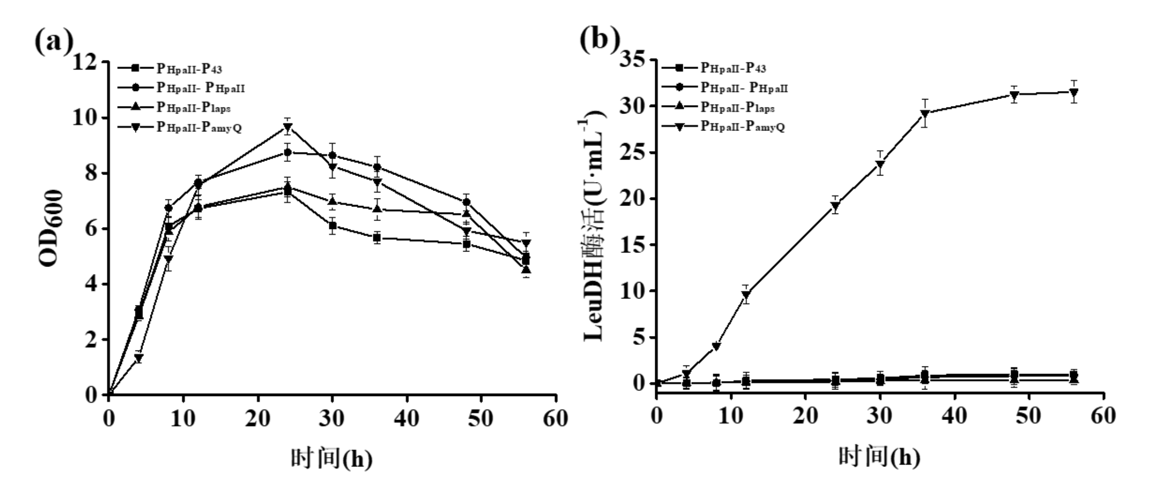


图 6 含组成型启动子重组菌生长曲线(a)和相应酶活测定(b)

Fig. 6 Cell growth curves (a) and extracellular enzyme activity curves of different recombinants with constitutive promoters (b)

从图 6 (a)可以看出，含 P_{43}、P_{laps}、P_{HpaII} 和 P_{amyQ} 启动子的重组菌均培养到 24 h 时 OD_{600} 达到最大，分别为 7.32，7.5，8.75 和 9.69，与重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*leudh* 在培养到 24 h 时菌体浓度为 11.47 相比，添加启动子后各重组菌生长受到一定限制，尤其是 P_{43} 和 P_{laps} 启动子，可能是 P_{43} 和 P_{laps} 均由两个启动子组成，对重组菌生长产生胁迫，导致菌体浓度下降。

在不同时间段对各菌株产 LeuDH 进行活性测定，如图 6 (b)所示。添加的 4 种启动子产酶水平差异较大，启动子 P_{amyQ} 的效果最优，48 h 时胞外活性为 31.24 $U{\cdot}mL^{-1}$，是原始重组菌的 3.45 倍；其他三种启动子 P_{43}、P_{laps} 和 P_{HpaII}，对 LeuDH 的调控效果不佳，对应的胞外活性仅为 0.99 $U{\cdot}mL^{-1}$、0.32 $U{\cdot}mL^{-1}$ 和 0.80 $U{\cdot}mL^{-1}$。杨明明等[8]筛选的强启动子 P_{laps} 对酶的表达强度比 P_{43} 提高了 14 倍，但该启动子对增强 LeuDH 的表达作用不明显。各重组菌具体产酶情况见表 3。

表 3 添加不同组成型型启动子重组菌产酶的比较

Table 3 Comparison of LeuDH activity by recombinants contained different constitutive promoters

重组菌	培养时间（h）	胞外活性 ($U{\cdot}mL^{-1}$)	胞内活性 ($U{\cdot}mL^{-1}$)	总酶活 ($U{\cdot}mL^{-1}$)
B. subtilis 168/pW3(P_{HpaII}-P_{43})	48	0.99	2.52	3.51
B. subtilis 168/pW4(P_{HpaII}-P_{laps})	48	0.32	3.69	4.01
B. subtilis 168/pW5(P_{HpaII}-P_{HpaII})	48	0.80	1.11	1.91
B. subtilis 168/pW6(P_{HpaII}-P_{amyQ})	48	31.24	36.89	68.31

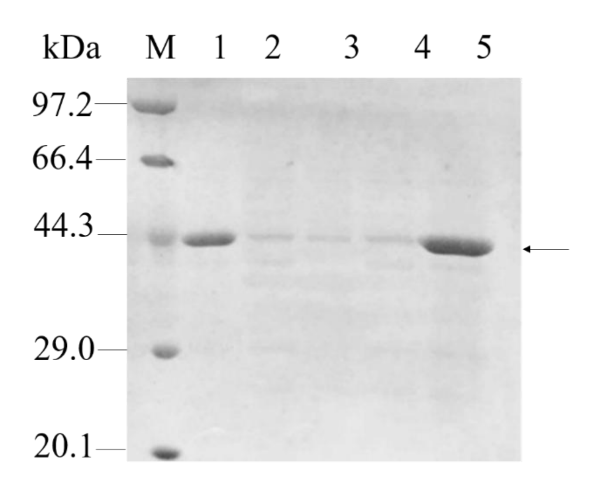


图 7 含组成型启动子重组菌产 LeuDH 发酵上清的 SDS-PAGE

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of LeuDH extracellular activity contained consistive promoters

M: Protein marker (Low); 1: culture supernatants of *B. subtilis* 168/pMA5-*leudh* (P_{HpaII}) (control); 2: culture supernatants of *B. subtilis* 168/pW3 (P_{HpaII}-P_{43}); 3: culture supernatants of *B. subtilis* 168/pW4 (P_{HpaII}-P_{laps}); 4: culture supernatants of *B. subtilis* 168/pW5 (P_{HpaII}-P_{HpaII}); 5: culture supernatants of *B. subtilis* 168/pW6 (P_{HpaII}-P_{amyQ})

选择的 4 种启动子 P_{HpaII}、P_{laps}、P_{43} 和 P_{amyQ} 中，前三种对 LeuDH 的表达量抑制明显，胞外活性很低，几乎不产酶，可能是添加的启动子 SD 序列和起始密码子之间的间隔区长度不合适，影响了启动子的转录起始；或者是由于启动子添加后，对菌体生长以及菌体内一些代谢机制造成干扰，影响后续蛋白翻译；此外，也可能是蛋白翻译完成后，不能正确折叠，导致形成了不完整的蛋白。启动子 P_{amyQ} 在 LeuDH 表达上作用明显，主要是 P_{amyQ} 提高了 mRNA 的转录强度[18]，增加了 mRNA 水平，使 LeuDH 得到高效表达。对添加了启动子的重组菌的发酵上清液进行 SDS-PAGE 检测，结果如图 7 所示。4 泳道对应菌株 *B. subtilis* 168/pW6 (P_{HpaII}-P_{amyQ})的条带明显粗于其他几个泳道，表明启动子 P_{amyQ} 对 LeuDH 表达优于其他三种启动子，促进效果最明显。

2.3 双启动子融合信号肽对重组酶表达的影响

2.3.1 重组质粒 pW6I、pW6II、pW6III、pW6IV 的构建与鉴定

含双启动子 P_{HpaII}-P_{amyQ} 的重组菌有效提高了 LeuDH 酶活，但胞内蛋白含量较多，为更好的研究启动子与信号肽对 LeuDH 分泌表达的影响，在最佳双启动子 P_{HpaII}-P_{amyQ} 后融合 2.2 中分泌效果较好的 4 种信号肽 AmyQ、SacB、PhoD 和 YwbN，期望筛选到适合 LeuDH 分泌表达的最佳组合，将胞内蛋白引导到胞外，提高胞外表达量。构建含双启动子和信号肽的分泌表达质粒 pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ)，如图 8 所示。

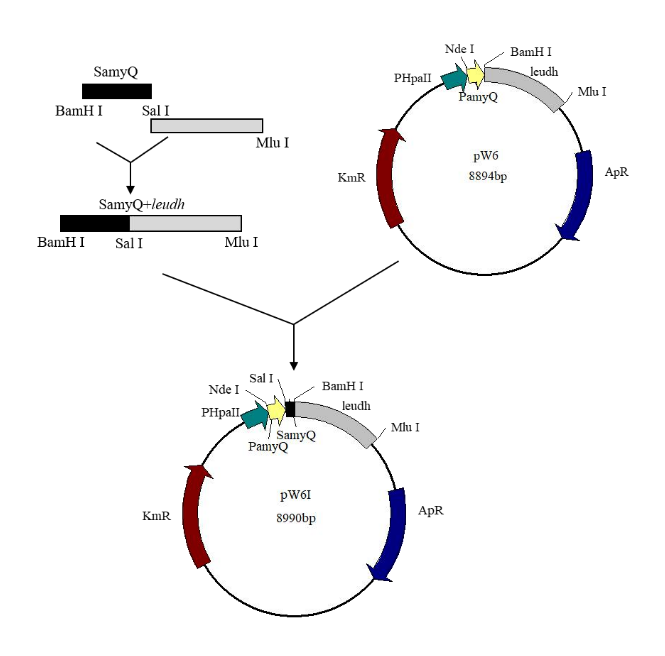


图 8 重组质粒 pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ)构建示意图

Fig. 8 Construction procedure of recombinant plasmid pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ)

扩增获得的 AmyQ 和目的基因 *leudh* 大小分别约为 96 bp 和 1119 bp，融合片段大小约为 1215 bp，与理论值相符，如图 9 (a)。融合的片段经胶回收，与质粒 pW6 (P_{HpaII}-P_{amyQ}) 同时双酶切构建重组质粒 pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ)，之后转化克隆宿主 *E. coli* JM109，

提质粒酶切验证，验证结果如图 9 (b)。由于信号肽 AmyQ 的片段较短，选用 *Bam*H

I 和 *Sal* I 位点进行酶切不易观察到条带，因此选择将信号肽与目的基因作为整体进行酶切验证。

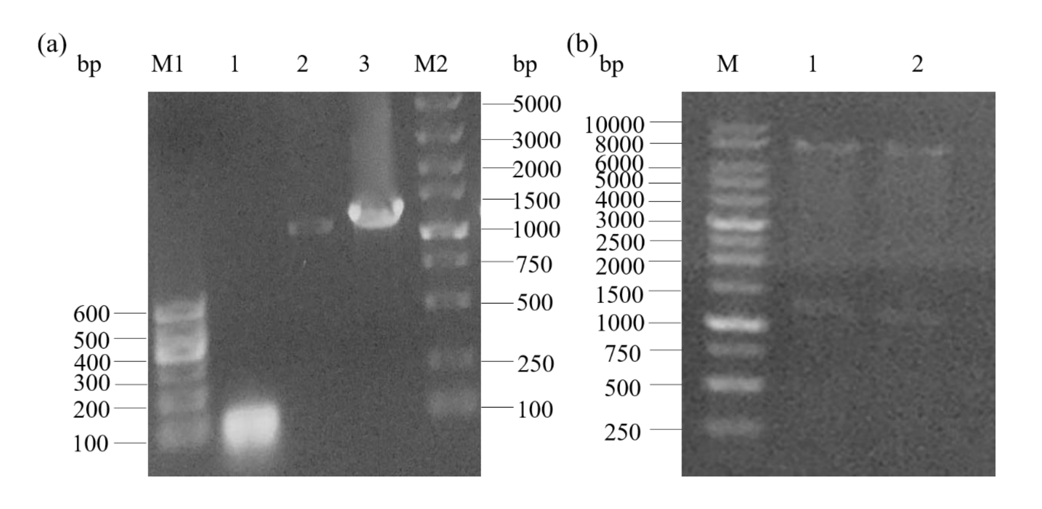


图 9 基因融合 PCR (a)和质粒 pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ)双酶切验证(b)

Fig. 9 Gene overlap PCR (a) and restriction digestion of plasmids pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ) (b)

(a) M1, M2: marker; 1: PCR verification of AmyQ; 2: PCR verification of *leudh*; 3: PCR verification of AmyQ-*leudh*; (b) M:marker; 1: pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ) double digested with *Bam*H I and *Sal* I; 2: pW6 (P_{HpaII}-P_{amyQ}) double digested with *Bam*H I and *Sal* I (control)

质粒 pW6II (P_{HpaII}-P_{amyQ}, SacB)、pW6III (P_{HpaII}-P_{amyQ}, PhoD)和 pW6IV (P_{HpaII}-P_{amyQ}, YwbN)的构建，只需在信号肽的 N 端和 C 端分别引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Sal* I，通过酶切位点将 SacB、PhoD 和 YwbN 信号肽与质粒 pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ)上的 AmyQ 信号肽进行替换，完成重组质粒的构建。对各重组质粒进行双酶切验证，结果如图 10 所示。

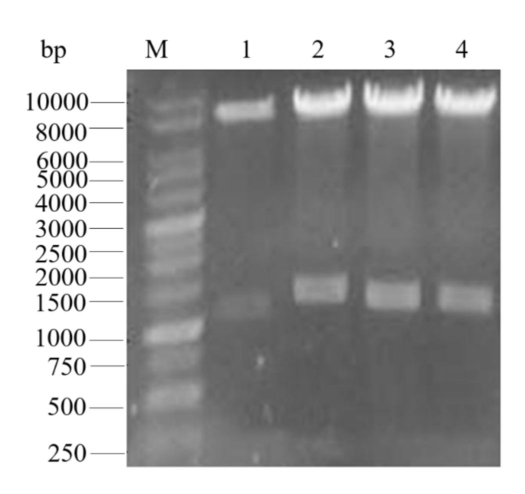


图 10 双启动子融合信号肽重组质粒双酶切验证

Fig.10 Restriction digestion of recombinant plasmids with double promoters and signal peptides

M: marker; 1: pMA5-*leudh* double digested with *Bam*H I and *Sal* I (control); 2: pM6III (P_{HpaII}-P_{amyQ}, PhoD) double digested with *Bam*H I and *Sal* I; 3: pW6II (P_{HpaII}-P_{amyQ}, SacB) double digested with *Bam*H I and *Sal*

I; 4: pW6IV (P_{HpaII}-P_{amyQ}, YwbN) double digested with *Bam*H I and *Sal* I

2.3.2 最佳双启动子 P_{HpaII}-P_{amyQ} 与信号肽的融合表达

对加入启动子和信号肽的重组菌进行生长曲线和发酵产酶曲线的测定。测定结果表明，重组菌 *B. subtilis* 168/pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ)，*B. subtilis* 168/pW6II (P_{HpaII}-P_{amyQ}, SacB)和 *B. subtilis* 168/pW6IV (P_{HpaII}-P_{amyQ}, YwbN)均在 24 h 时 OD_{600} 最大，分别为 7.54，7.83 和 11.07；重组菌 *B. subtilis* 168/pW6III (P_{HpaII}-P_{amyQ}, PhoD)在 36 h 时 OD_{600} 最大，为 8.87，该重组菌生长至对数期所用的时间比其他菌株长，可能是由于信号肽 PhoD 片段大小（约为 153 bp）比一般的信号肽要长很多，对菌体生长产生压力，延缓了生长。

重组菌不同时间段胞外酶活曲线的测定结果如图 11 所示，菌体浓度最大时与产酶最高点不在同一时间点，在培养后期酶活有明显的增加。重组菌 *B. subtilis* 168/pW6IV (P_{HpaII}-P_{amyQ}, YwbN)增幅最大且活性最高，在 48 h 达到 21.76 U·mL^{-1}，之后酶活增加趋势不明显；*B. subtilis* 168/pW6III (P_{HpaII}-P_{amyQ}, PhoD)产酶量有所下降，活性为 6.49 U·mL^{-1}；*B. subtilis* 168/pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ)，*B. subtilis* 168/pW6II (P_{HpaII}-P_{amyQ}, SacB)则产酶水平很低，活性分别为 0.44 U·mL^{-1} 和 1.69 U·mL^{-1}，具体活性见表 4 所示。

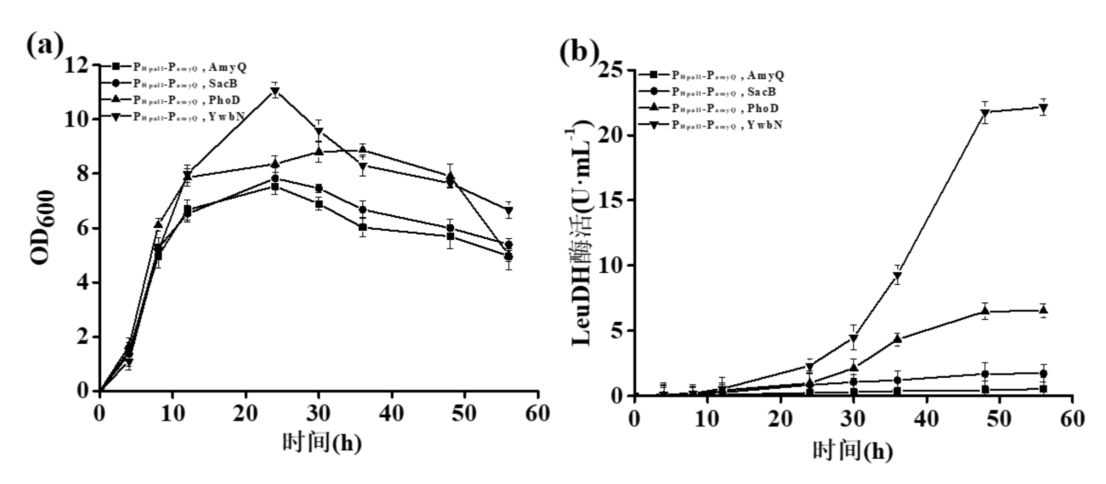


图 11 含双启动和信号肽重组菌生长曲线(a)和相应酶活测定(b)

Fig. 11 Cell growth curves (a) and extracellular enzyme activity curves of different recombinants with dual promoter and signal peptides (b)

表 4 各重组菌表达 LeuDH 酶活数据

Table 3.3 LeuDH activity of *B. subtilis*168/pW6 with different signal peptides

重组菌	胞外酶活 (U·mL^{-1})	胞内酶活 (U·mL^{-1})	总酶活 (U·mL^{-1})
*B. subtilis*168/pW6I (P_{HpaII}-P_{amyQ}, AmyQ)	0.44	0.65	1.09
*B. subtilis*168/pW6II (P_{HpaII}-P_{amyQ}, SacB)	1.69	3.47	5.16
*B. subtilis*168/pW6III (P_{HpaII}-P_{amyQ}, PhoD)	6.49	18.09	24.58
*B. subtilis*168/pW6IV (P_{HpaII}-P_{amyQ}, YwbN)	21.76	31.60	53.36

从测定的酶活结果可以看出，双启动子 P_{HpaII}-P_{amyQ} 后融合信号肽 YwbN 对 LeuDH 的表达效果最好，最高活性为 21.76 U·mL^{-1}；融合信号肽 AmyQ 和 SacB 后，对酶的表达造成影响，胞外活性和总酶活都很低，不利于产酶；加入的 PhoD 信号肽，酶活较前两者有所提高，但与之前研究中的重组菌 *B. subtilis* 168/pW07 (P_{HpaII}, PhoD)[16]的产酶水平相比，胞外活性以及分泌效率都有所下降，可能是加入的新启动子与信号肽匹配上发生改变导致的。

分泌效果最优的菌株 *B. subtilis* 168/pW6IV (P_{HpaII}-P_{amyQ}, YwbN) 与仅含双启动子 P_{HpaII}-P_{amyQ} 的 *B. subtilis* 168/pW6 菌株相比，酶活降低，推测的主要原因是信号肽的加入使启动子中 SD 序列与目的基因之间碱基间隔发生变化，造成双启动子对 LeuDH 的启动强度下降；与在质粒 pMA5 自身启动子后直接加信号肽 YwbN[16]相比，胞外活性以及分泌效率都明显提高，产生这种现象可能是启动子 P_{amyQ} 的加入强化了转录起始以及双启动子 P_{HpaII}-P_{amyQ} 与信号肽 YwbN 在匹配度上更加契合的原因。

2.4　7.5 L 发酵罐产 LeuDH 研究

将产酶活性最好的重组菌 *B. subtilis* 168/pW6 于 7.5 L 发酵罐中进行小试实验，探究菌株生长和产酶状况。种子液活化后，按照 4%的接种量转接至含有 3 L 发酵培养基的发酵罐中，设定空气流速为 3 L·min^{-1}，溶氧通过限定搅拌转速在 400-600 r·min^{-1} 间维持在 30%左右；pH 7.0，由 50% H_3PO_4 和 30% $NH_4 \cdot H_2O$ 调控；温度设定 37°C。在发酵进程中采用不补料和持续流加补料策略（发酵约 12 h，葡萄糖将要耗尽完全，开始流加补料，补料速率约为 2 g·L^{-1}·h^{-1} 葡萄糖），考察补料对发酵产 LeuDH 的效果。

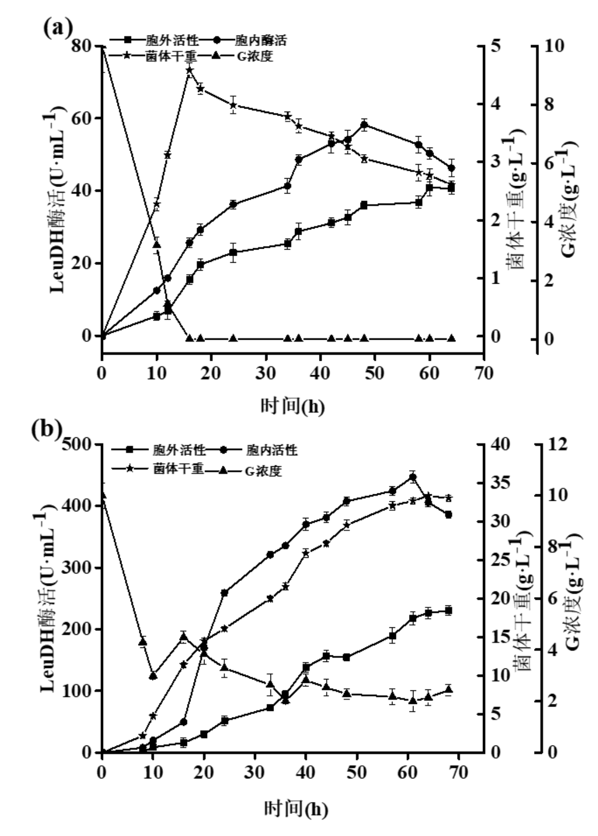


图 12 未补料(a)和补料(b)对重组菌发酵产酶影响

Fig. 12 Effect of no feeding (a) and feeding (b) on enzyme production by recombinant

从图 12 (a)可以看出，16 h 时葡萄糖消耗完全，菌体量为 4.58 g(干重)·L^{-1}，60 h 时，胞外活性为 40.90 U·mL^{-1}，与摇瓶发酵水平相当，存在小幅度下降。在未进行补料的条件下，重组菌在发酵后期营养物质供应不及时，影响了重组菌的生长，导致菌体量及产酶受到影响。

对重组菌进行流加补料，结果如图 12 (b)所示，菌株菌体量和 LeuDH 活性均有明显的增加，菌体干重达到 33.29 g·L^{-1}，是未补料时的 7.27 倍；60 h 时 LeuDH 总酶活达到最大值，为 664.76 U·mL^{-1}，其中胞内活性达到 446.80 U·mL^{-1}，胞外活性为 217.96 U·mL^{-1}，是摇瓶产 LeuDH 水平的 6.97 倍。

3 小 结

来源于 *B. cereus* 的亮氨酸脱氢酶基因已经在 *B. subtilis* 168 中表达成功，并通过变换信号肽提高了酶活[16]，本文在此基础上尝试双启动子和信号肽添加策略进一步提高 LeuDH 的表达，并进行 7.5 L 发酵罐的发酵小试初探。

在启动子 P_{HpaII} 后分别添加 6 种不同的启动子（诱导型启动子 P_{grac}、$P_{glv\text{-}M1}$ 和组成型启动子 P_{43}、P_{laps}、P_{HpaII}、P_{amyQ}），与组成型启动子 P_{amyQ} 形成的双启动子强化作用最明显，胞外活性为 31.24 U·mL^{-1}，是添加启动子前的 3.4 倍；诱导型启动子 P_{grac}、$P_{glv\text{-}M1}$ 分别用 0.8 mmol·L^{-1} IPTG、2%的麦芽糖诱导 24 h 和 32 h，活性仅为 1.87 U·mL^{-1} 和 0.82 U·mL^{-1}，不利于表达。在效果最好的 P_{HpaII}-P_{amyQ} 启动子基础上，选择添加 AmyQ、SacB、PhoD、YwbN 四种信号肽，其中 YwbN 信号肽对酶的表达有一定作用，但融合的 4 种信号肽均没有进一步提高 LeuDH 的活性。

选用产酶效果最好的菌株 *B. subtilis* 168/pW6 于 7.5 L 发酵罐进行发酵产酶研究，流加补料葡萄糖后，获得产酶水平达到 217.96 U·mL^{-1}，为摇瓶水平的 6.97 倍，可为工业上高产亮氨酸脱氢酶提供参考。

参考文献

[1] Li J, Pan J, Zhang J, et al. Stereoselective synthesis of L-tert-leucine by a newly cloned leucine dehydrogenase from *Exiguobacterium sibiricum*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 105(7): 11-17.

[2] Cooper A J, Conway M, Hutson S M. A continuous 96-well plate spectrophotometric assay for branched-chain amino acid aminotransferases. Analytical Biochemistry, 2002, 308(1): 100–105.

[3] Wendel U, Gonzales J, Hummel W, et al. Neonatal screening for maple syrup urine disease by an enzyme-mediated colorimetric method. Clinica Chimica Acta, 1993, 219(1-2): 105-111.

[4] Ohshima T, Misono S, Soda K. Determination of branched-chain L-amino acids and their keto-analogs with leucine dehydrogenase. Agricultural and Biological Chemistry, 1978, 42(10): 1919-1922.

[5] Chiang C J, Chen P T, Chao Y P. Secreted production of renilla luciferase in *Bacillus subtilis*. Biotechnology Progress, 2010, 26(2): 589-594.

[6] Paccez J D, Luiz W B, Sbrogio-Almeida M E, et al. Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery. Vaccine, 2006, 24(15): 2935- 2943.

[7] Zyprian E, Matzura H. Characterization of signals promoting gene expression on the *Staphylococcus aureus* plasmid pUB110 and development of a Gram-positive expression vector system. DNA, 1986, 5(3):219–225.

[8] Yang M M, Zhang W, Ji S, et al. Generation of an artificial double promoter for protein expression in *Bacillus subtilis* through a promoter trap system. Plos One, 2013, 8(2): e56321.

[9] Gupta M, Rao K K. Phosphorylation of DegU is essential for activation of amyE expression in *Bacillus subtilis*. Journal of Biosciences, 2014;39(5):747–752.

[10] Kim L, Mogk A, Schumann W. A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its applicaton. Gene, 1996, 181(1-2): 71-76.

[11] Phan T T, Nguyen H D, Schumann W. Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements. Journal of Biotechnology, 2012, 157(1): 167-172.

[12] Hartl B, Wehrl W, Wiegert T, et al. Development of a new integration site within the *Bacillus subtilis* chromosome and construction of conpatible expression cassettes. Journal of Biotechnology, 2001, 183(8): 2696-2699.

[13] Guan C, Cui W, Cheng J, et al. Construction of a highly active secretory expression system via an engineered dual promoter and a highly efficient signal peptide in *Bacillus subtilis*. New Biotechnology, 2016, 33(3):372-379.

[14] 周勇. 嗜麦芽糖寡养单胞菌脂肪酶 LipS 在枯草芽孢杆菌中的高效分泌表达. 杭州: 浙江大学, 2015.

Zhou Y. High level secretion expression of a lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* in *Bacillus subtilis*. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.

[15] 夏雨, 成玉梁, 李达倩, 等. 枯草芽孢杆菌分泌载体构建及其对脂肪酶 A 的分泌表达. 安徽农业科学, 2011, 39(30): 18435-18437.

Xia Y, Cheng Y R, Li D Q, et al. Construction of secretory expression vectors for Bacillus subtilis and secretion of Lipase A. Journal of Anhui Agriculture, 2011, 39(30): 18435-18437.

[16] 王男, 金吕华, 张玲, 等. 信号肽对亮氨酸脱氢酶在 *Bacillus subtilis* 中分泌表达的影响及酶学性质研究. 中国生物工程杂志, 2018,38(4): 46-53.

Wang N, Jin L H, Zhang L, et al. The Effect of signal peptides on the expression of leucine dehydrogenase and enzymatic properties in *Bacillus subtilis*. China Biotechnology, 2018,38(4): 46-53.

[17] 夏雨.枯草芽孢杆菌食品级表达系统的构建和分泌表达研究. 无锡: 江南大学, 2007.

Xia Y. Construction of food-grade expression systems and study of protein secretion in *Bacillus subtilis*. Wuxi: Jiangnan University, 2007.

[18] Kang Z, Su L, Duan X, et al. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis*, using an optimized dual-promoter expression system. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1):32.

To promote the expression of leucine dehydrogenase in *Bacillus subtilis* via dual-promoter and fermentation research*

ZHANG Ling， WANG Nan， JIN Lv-hua， LIN Rong， YANG Hai-lin

(Key laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China)

Abstract： In order to promote the efficient expression of leucine dehydrogenase in *Bacillus subtilis*, the inducible and constitutive promoters were inserted downstream of P_{HpaII}, which is the native promoter of plasmid pMA5, to investigate the effect on LeuDH by dual-promoter. Two inducible promoters (P_{grac}, $P_{glv\text{-}M1}$) and four constitutive promoters (P_{43}, P_{laps}, P_{HpaII}, P_{amyQ}) were selected for expression of LeuDH. The dual promoter was consisted in the constitutive promoter P_{amyQ} and P_{HpaII} had the best performance, reaching 31.24 $U{\cdot}mL^{-1}$, which was 3.4 times higher than that of the single promoter P_{HpaII}. Four The signal peptides of Sec pathway and Tat pathway were fused to behind the best dual-promoter P_{HpaII}-P_{amyQ}, respectively. However, this combination did not gave higher enzyme activity. The strain *B. subtlis* 168/pW6 with the best activity of producing leucine dehydrogenase were analyzed in 7.5 L fermenter. The enzyme activity reached 217.96 $U{\cdot}mL^{-1}$, which was 6.97 times higher than the shake flask level. The results for industrial production of leucine dehydrogenase has a certain reference value.

Key words Leucine dehydrogenase *Bacillus subtilis* Dual-promoter signal peptide fermentation enzyme production